

花粉における戦略分子 RNA —特に細胞間を移行する RNA に焦点を当てて—

元村 一基^{1,2}

¹立命館大学 総合科学技術研究機構
〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

²科学技術振興機構・さきがけ
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

RNA as a Strategic Molecule in Pollen -Special Focus on mobile RNAs-

Kazuki Motomura^{1,2}

¹Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga
525-8577, Japan

²JST, PRESTO, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: intercellular communication, mobile RNA, plant reproduction, pollen

DOI: 10.24480/bsj-review.15a4.00257

1. はじめに

生物学の講義では、RNA はセントラルドグマにおいて遺伝情報を伝達するものであると学ぶ。しかし、多細胞生物における RNA は遺伝子発現の単なる中間体にとどまらず、その機能や役割は複雑かつ多様である。特に固い細胞壁に囲まれ、細胞が動けない植物にとって、細胞間コミュニケーションの手段として RNA が果たす役割は重要である。事実、発生や環境応答など様々な生命現象において、細胞間を移行する複数の RNA が発見されている（本論文では「モバイル RNA」と呼称する）。small interfering RNA (siRNA) などの small RNA (sRNA) は、モバイル RNA の代表例である。ウイルスに感染した植物では、siRNA が細胞間を移行し、維管束を通じて運ばれることで植物全体でウイルス防御反応を引き起こす（Lopez-Gomollon and Baulcombe 2022）。また、mRNA もモバイル RNA として働き、その細胞間移行は植物の正確な遺伝子発現には欠かせない。たとえば、FLOWERING LOCUS T (FT) はタンパク質自身に加えて、mRNA が葉から頂端部へ移動し、花成を調節するのではないかと考えられている（Li et al. 2011, Yu et al. 2021）。RNA が遠く離れた細胞へ移行するためには、まず RNA が隣接する細胞へ移行する必要がある。これまでの研究から、隣接する細胞への RNA 移行経路として、原形質連絡（Plasmodesmata）を介したシンプラスト経路や、エクソソーム様の細胞外小胞を介したアポプラスト経路が見つかってきている（Liu and Chen 2018; Maizel et al. 2020; Wang and Dean 2020）（図 1）。しかし、これまで機能的なモバイル RNA は数えるほどしか見つかっておらず、その選択性など未解明な点が多く残されている。

近年、被子植物の生殖組織「花粉」においても、RNA が細胞間を移行することが報告されてきている（Wu and Zheng 2019）。花粉は細胞が入れ子構造になった珍しい組織である。

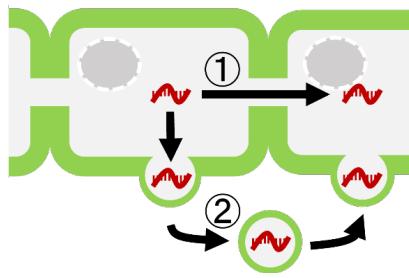


図1. 予想されるモバイル RNA の移行経路

これまで植物の体細胞研究で見つかったモバイル RNA (赤色) の多くは, ①原形質連絡を通して運ばれるか, あるいは②細胞外小胞に乗って隣の細胞へと輸送されるか, どちらかの経路で隣接細胞へと移行すると考えられている。

シロイヌナズナの花粉を例にすると, 2個の精細胞がまるでオルガネラのように栄養細胞の内部に存在する。これら2つの精細胞は, 栄養細胞に由来する生体膜である内部形質膜に包まれている (Motomura et al. 2021; Sugi et al. 2023)。そして, 片方の精細胞から伸びた尻尾状の構造が栄養細胞の核, すなわち栄養核と強固に結びつき複合体を形成している (Mogensen 1992; McCue et al. 2011) (図2)。2つの精細胞は雌しべ奥深くの胚珠へと運ばれ, 卵細胞と中央細胞の間に放出され, 重複受精することで種子を形成する (Hamamura et al. 2011; Higashiyama and Takeuchi 2015; Sugi et al. 2023)。近年, この花粉を舞台に, RNA が様々な形で戦略分子として機能し, それが種子植物の繁栄を支えていることが明らかになってきた。そこで本論文では, シロイヌナズナ花粉を材料とした最新の研究成果を中心に, 戦略分子として機能する RNA の代表例として, モバイル RNA の発見の歴史と, その役割や, 予想される輸送機構について紹介する。またモバイル RNA 以外にも, 花粉が RNA をどのように戦略分子として活用しているかについての例を紹介し, 最後に, 進化的観点も含めたその役割や今後の研究展開について論じる。

2. 花粉におけるモバイル RNA の発見

被子植物の花粉の中で, 精細胞は栄養細胞に取り囲まれており, 受精の直前まで外界環境と接することがない。また精細胞はその大部分が核に占められ, 細胞質領域は非常に限られている。そのため以前から, 唯一の隣接細胞である栄養細胞との間で, 物質のやり取りを行う可能性は議論されていた (McCue et al. 2011)。精細胞と栄養細胞間のモバイル RNA として最初に報告されたのは, transposable element (TE) 由来の siRNA であった。哺乳類やショウジョウバエでは, PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる小分子 RNA が生殖細胞で TE の発現を抑制することで生殖組織のゲノムを保護する (Brennecke et al. 2007, 2008; Wang et al. 2023b)。一方, 植物においても生殖細胞ゲノムの保護は必須であると考えられるが, 被

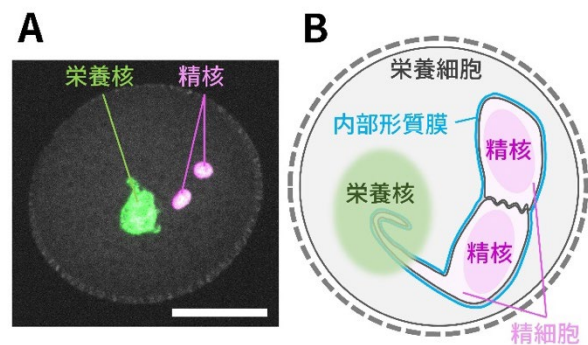


図2. (A) シロイヌナズナ花粉の蛍光顕微鏡写真。緑は花粉細胞 (栄養細胞) の核である栄養核で, マゼンタは精細胞の核である精核。Bar: 10 μm 。(B) シロイヌナズナ花粉の模式図。2つの精細胞は内部形質膜に包まれている。一方の精細胞からは尻尾状の突起が伸び, 栄養核に物理的に巻き付いて複合体を形成している。

子植物はゲノム上に piRNA に関与する遺伝子群を持たず、どのように生殖細胞の TE 発現を抑制するのかは分かっていなかった。Slotkin らは 2009 年、植物でも動物と類似の機構が存在することを提唱した (Slotkin et al. 2009)。この論文では、栄養細胞で DNA メチル化酵素である DDM 1 の遺伝子発現が消失することで栄養細胞中で TE の発現が活性化し、この TE を材料に siRNA の一種である epigenetically activated siRNAs (easiRNAs) が作られ、精細胞へ移行することで精細胞内における TE 発現を抑制するモデルが提唱された (図 3)。植物ではウイルスやトランスポゾンなどを材料に、二次的な siRNA を生成する機構が備わっている (Vaucheret and Voinnet 2024)。受精してゲノムが次世代に伝わる精細胞と異なり、栄養細胞のゲノムは次世代には伝わらない。その栄養細胞が自己犠牲のような形で TE に対する siRNA を生産して、生殖細胞である精細胞を守るというこのモデルは、動物が体細胞から piRNA を送り込む現象と類似しており、進化的にも魅力的かつ現実的な説であった。

ところが、2013 年にこれを否定する研究が報告された。前述した 2009 年の論文では、sRNA が精細胞へ移行する根拠として、栄養細胞に特異的な *LAT52* プロモーターにより GFP を発現抑制する人工的な micro RNA (miRNA) を発現させたところ、精細胞に移行して GFP の発現を抑制した現象を報告していた (Slotkin et al. 2009)。しかしながら、2013 年の論文では、*LAT52* プロモーター下流の遺伝子が精細胞でも弱く発現することを指摘しており、*LAT52* プロモーターによって精細胞で発現した siRNA が、精細胞の GFP 蛍光を低下させた可能性を論じた (Grant-Downton et al. 2013)。それを支持する証拠として、真に栄養細胞特異的な遺伝子である *VCK1* プロモーターで同じ miRNA を発現させても、精細胞の GFP 発現は抑制されることが分かった。

混沌とした状況に一つの決着をつけたのは、2016 年に Slotkin らが“TAS 経路”を利用して栄養細胞由来の siRNA により精細胞での遺伝子発現の抑制を実現したという論文である。TAS 経路は、生合成機構がよく知られる植物の sRNA 合成経路の一つである。シロイヌナズナにおいて、ゲノム上に存在する *TAS* と呼ばれる遺伝子から RNA が転写されると、この *TAS* RNA と相補的な miRNA (miR173 や miR390 が該当する) を

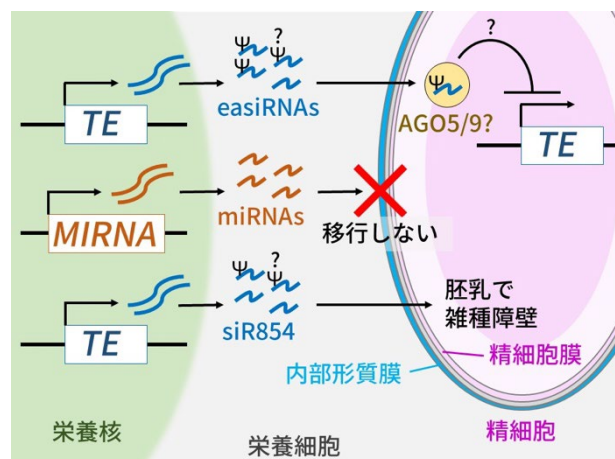


図 3. 幾つかの研究から予想される選択的な sRNA の精細胞への移行・メカニズムとその役割のモデル図

TE に由来する easiRNA はシュードウリジン化 (Ψ) され、選択的に精細胞へ移行する。そして AGO5 や AGO9 に取り込まれ、精細胞で TE 発現を抑制する可能性が提唱されている。一方、ゲノム上の *MIRNA* 遺伝子から転写され、その転写物がステムループ構造を取ることで生成される miRNA については精細胞には移行しないことが想定されている。また、TE に由来する siRNA の一つである siR854 も精細胞へ移行するが、その役割は受精後の胚乳で *UBPIB* という遺伝子発現を抑制することで、2 倍体植物と 4 倍体植物の雑種を防ぐことだと考えられている。

取り込んだ Argonaute (AGO) に認識される。その結果、RNA 二本鎖化酵素である RDR6 により TAS RNA が二本鎖化されたのち、DCL4 によって 21 塩基長の複数の sRNA へとプロセシングされ、sRNA が産生される (de Felippes et al. 2011)。Slotkin らは前述した *VCK1* プロモーターの制御下で、miR173 結合配列に GFP 遺伝子配列の一部を繋いだ mRNA を発現させた。この mRNA の miR173 結合配列を AGO が認識すると、TAS 経路を利用して GFP 発現を抑制する siRNA が生成する。こうしてできた栄養細胞由来の siRNA は、精細胞の GFP 発現を抑制することが分かった (Martínez et al. 2016)。更に別の研究では、TAS 経路を利用した人工的な siRNA に限らず、miR845 という miRNA の効果により産生される、内在性 easiRNA も精細胞へ移行することが報告された (Borges et al. 2018)。これらの実験から、栄養細胞で作られた sRNA が精細胞に移行して機能することは確かなようである。またこれらの実験とは独立して、アブシシン酸を負に制御する酵素 ABA-hypersensitive germination3 (AHG3) をコードする mRNA も精細胞へ移行することが報告され、sRNA だけでなく mRNA も精細胞へ移行しうることが明らかとなった (Jiang et al. 2015)。mRNA については、AHG3 以外にはまだ花粉におけるモバイル mRNA の報告例は筆者の知る限り無く、花粉の機能に關与するモバイル mRNA の報告が待たれる。

3. 花粉のモバイル RNA の機能

花粉において栄養細胞から精細胞への移行が確認されたモバイル RNA は、TE 由来の siRNA や AHG3 mRNA など数えるほどしかない。しかしながら TE の発現抑制以外にも、モバイル RNA が關与しないと説明がつかない、重要な生殖現象が報告されている。TE に由来する siRNA の一つである siR854 は栄養細胞で産生され、おそらく精細胞へ移行したのち、重複受精を経て胚乳へ運ばれる。そして胚乳において *UBPIB* という遺伝子を制御することで胚乳発達を制御する。胚乳は胚発生に必須の栄養を貯蔵する種子内の組織であり、この正常な発達は胚発生に必須である。しかしながら siR854 や *UBPIB* の発現量は絶妙なバランスで制御されており、この siR854 や *UBPIB* の存在比が 2 倍体の種親と 4 倍体の種親の交配によって破綻すると (ゲノム中の遺伝子数の違いが影響すると考えられている)、雑種障壁が引き起こされる。このように siR854 の働きによって、3 倍体植物ができることを防ぐ “triploid block” が起きることが示唆されている (Martínez et al. 2018; Wang et al. 2018) (図 3)。この例を始めとして、花粉におけるモバイル RNA はゲノム保護や染色体総数の制御など、進化的な側面において鍵を握る現象を制御する例が多いようである。

栄養細胞と精細胞の間の RNA 細胞間移行に加えて、花粉は体細胞組織からもモバイル RNA を受容する。例えば、葯の中の表皮組織やタペート層で作られたモバイル sRNA が、発生途中の花粉母細胞へ細胞間移行すると考えられている (Long et al. 2021)。これは、イネやトウモロコシの花粉母細胞において、体細胞で発現する特定の siRNA の前駆体がほとんど発現しないにも関わらず、成熟 siRNA が大量に存在することなど、幾つかの状況証拠があることから想定された説である (Zhai et al. 2015; Dukowic-Schulze et al. 2016)。siRNA が作れない変異体の解析から、これらのモバイル siRNA はエピジェネティックな制御を通じて、花粉の発生に寄与することが示唆されている (Nonomura et al. 2007; Teng et al. 2020; Tamotsu et al. 2023)。

体細胞組織から花粉へ移行するモバイル RNA については複数の植物種で報告があることから、植物にとって種を超えて重要な分子であることが想定されるが、それに関連した報告例はまだ両手で数えられるほどに限られている。花粉に関連したモバイル sRNA の機能については近年でも多くの総説が書かれている。詳細についてはそちらを参照されたい (Martinez and Köhler 2017; Nonomura 2018; Chow and Mosher 2023; Zhan and Meyers 2023)。

4. 花粉において予想されるモバイル RNA の移行経路

精細胞は、自身の細胞膜に加えて、栄養細胞由来の生体膜である内部形質膜に覆われている。そのため他の組織の細胞間と同様に、2つの細胞の細胞質の間には、2枚の細胞膜と細胞壁が存在すると考えられる (図2, 3)。実際にアブラナやテッポウユリの花粉では、プロテオグリカン的一种であるアラビノガラクトナンタンパク質が精細胞周辺に存在することが報告されており、精細胞周辺には何らかの細胞壁様構造が存在することが予想される (Southworth and Kwiatkowski 1996)。多くの植物組織において、異なる細胞への物質移行は、主に細胞と細胞の間を繋ぐ原形質連絡を通して行われる (Lucas and Lee 2004; Kitagawa et al. 2023) (図1)。しかしながら、花粉中の栄養細胞と精細胞の間では、原形質連絡の有無についてははっきりしていない。例えば、二細胞性の花粉を持つ *Nicotiana tabacum* の花粉の電子顕微鏡像から、精細胞前駆体である雄原細胞と栄養細胞の間に、複数の原形質連絡様のチャンネルが発見された (Cresti et al. 1987)。しかしながら、花粉が発芽した後のサンプルでは、この原形質連絡様のチャンネルは発見されなかった (Cresti et al. 1987)。他にも様々な植物種の花粉が電子顕微鏡で観察されてきたものの、原形質連絡様のチャンネルの有無についてははっきりしていない (Russell 1984; Charzyńska et al. 1988; Weber 1988; Akita et al. 2021)。一つ言えることは、体細胞組織において原形質連絡形成に重要な役割を果たす“カロース”が精細胞周辺に存在しないことから、少なくとも精細胞に典型的 (一般的) な原形質連絡は存在しないのだろう (Motomura et al. 2021)。このように現在まで、精細胞の周辺の原形質連絡の存在の有無については決着がついていない。

RNA 細胞間移行経路の2つ目の候補として、近年植物の体細胞研究で報告された、動物のエクソソームと類似した細胞外小胞がある (Cai et al. 2018; Betti et al. 2021) (図1)。動物細胞では、細胞外小胞は Multivesicular body (MVB) と呼ばれる複数の小胞を包む後期エンドソームの一種から放出される。最近の研究から、灰色カビ病をもたらす植物感染性糸状菌に対して、植物細胞が MVB を介して mRNA や sRNA を送り込むことで防御応答を行う可能性が報告された (Wang et al. 2023a)。これらの報告から植物は細胞外小胞を利用して別の細胞へと選択的にモバイル RNA を輸送できる可能性が明らかとなったが、花粉において同様の細胞外小胞が存在するかどうかについては不明である。精細胞と栄養細胞の間の物質移行経路の第3の可能性として、栄養核と精細胞を繋ぐ尻尾構造がある (図2)。この構造により精細胞は栄養核と直接繋がっていることから、この尻尾構造を通じて栄養核から直接精細胞に RNA が送り込まれる可能性が想定されている。この尻尾構造については複数の植物種で電子顕微鏡像が報告されており、この尻尾構造は栄養核を貫くわけではなく、核に巻き付いた状態で存在するようである (Russell 1984; Yu et al. 1989; McCue et al. 2011)。仮にこの尻尾構造

を通過して RNA が移行するとしても、何らかの手段で内部形質膜や精細胞膜を通過する必要があると考えられる。一つ言えることとして、これまで精細胞で作られた RNA が栄養細胞へ移行する例は発見されておらず、モバイル RNA の移行には方向性が存在しているようである。モバイル RNA の移行メカニズムがその方向性を決めているのかもしれない。いずれにしても RNA 移行経路のうちどれが実際に寄与しているのか（あるいは複数の経路が存在するのか）は、まだ当該分野の大きな研究課題として残されている。

5. 花粉におけるモバイル RNA の選択性や移行メカニズムの考察

体細胞組織のモバイル RNA 長距離移行に目を向けると、量が多く安定性の高い RNA が受動的に流れていく“非選択的な移行”も存在する一方で、特定の RNA が積極的に輸送される“選択的な移行”があることが想定されている。この選択的な移行を決めるファクターとして、主に配列や構造などの関与が報告されてきている (Maizel et al. 2020)。例えば、同じ長さの miRNA と siRNA を比較すると、siRNA のほうが他の細胞への移行能力が高いことが分かっている (de Felippes et al. 2011)。この傾向は花粉でも同様であり、同じプロモーターで発現しているにも関わらず、人工 miRNA は精細胞で遺伝子発現を抑制できなかったのに対して、人工 siRNA や TE 由来の easiRNA は精細胞で遺伝子発現を抑制することができた (Grant-Downton et al. 2013; Martínez et al. 2016) (図 3)。このように、体細胞と花粉では何らかの共通のメカニズムが存在しており、特に sRNA は生合成の際にモバイル RNA として機能するかどうかの運命が決められるのかもしれない。複数の研究グループにより、前述した TAS 経路を利用して作らせたモバイル siRNA の実験系を利用することで、sRNA を取り込んで標的を切断する働きを持つ酵素 AGO など、幾つかのタンパク質がモバイル RNA の精細胞での機能に関与することが分かっている (Martínez et al. 2016; Wu et al. 2020)。類似した報告として、イネにおいても特定の AGO タンパク質がタペート組織から花粉への輸送に関与することが示唆されており、少なくとも sRNA は AGO タンパク質を利用して細胞間移行を行う可能性が高い (Tamotsu et al. 2023)。今後は前述した人工 siRNA 実験系を利用したスクリーニングなどによって、これまで未知であった花粉における RNA 輸送メカニズムの詳細が明らかになることが期待される。

モバイル RNA の選択性を決める別の例として、接ぎ木を用いた研究から、長距離移行する RNA には tRNA 様構造 (TLS) を持つものが多く含まれることが明らかとなった (Zhang et al. 2016)。TLS を繋いだ RNA が長距離輸送されることを利用して、接ぎ木により台木から穂木へと Cas9 mRNA とガイド RNA を移行させ、遺伝子組換え無しでゲノム編集を行う技術も実現され始めている (Yang et al. 2023)。また、構造ではなく RNA を修飾することで移行能力が上昇する例もあり、5-methylcytosine (m5C) 修飾がモバイル RNA で多数発見されている (Yang et al. 2019)。2023 年には、栄養細胞において miRNA の一つ、miR845 が切断した TE を材料に産生される二次的 siRNA である easiRNA の多くが、シュードウリジン (Ψ) 修飾を受けていることが報告された (Herridge et al. 2023)。この Ψ 修飾された easiRNA は精細胞特異的な AGO タンパク質である AGO5 や AGO9 に取り込まれていたことから、 Ψ 修飾は精細胞に移行するモバイル sRNA の目印になりうるのかもしれない (図 3)。体細胞のモバイル

RNA については、原形質連絡と細胞外小胞のどちらの経路においても、RNA 結合タンパク質が特定のモバイル RNA の運び屋として関与する可能性が報告されている (Maizel et al. 2020; He et al. 2021; Kitagawa et al. 2022)。恐らく花粉においても、RNA の修飾などを目印に特異的な RNA 結合タンパク質が RNA 移行を助けることが想定され、その発見が今後の研究の方向性の一つになるだろう。

6. 細胞間コミュニケーション以外の RNA の戦略的役割

ここまでモバイル RNA について議論してきたが、本項ではそれ以外の、花粉における戦略的な RNA 利用法について紹介する。自身の花粉を受容しない他殖の植物では、他の植物の雌蕊へと花粉が運ばれ受精する。このとき、成熟した花粉は脱水され休眠状態にあり、細胞活動はある意味休止した状態である。この脱水状態の花粉は数週間、あるいは植物種により一年以上も発芽能力を維持していると言われており、非常に頑健な機構を持つと考えられる (Mayer and Gottsberger 2000; Song and Tachibana 2007)。その頑健性と相反して、いったん雌蕊と出会い吸水した花粉は、数時間で発芽して伸長し続ける (Motomura et al. 2020)。この長期に渡る生命維持機構と素早い発芽への切り替えスイッチとして、mRNA が寄与しているようである。転写阻害剤実験などから、花粉の発芽には新たな転写は不要であり、翻訳さえできれば発芽には十分であることが知られている (Honys and Twell 2004; Hao et al. 2005)。恐らく花粉は、mRNA を安定化させて保持することで生命活動を維持しており、転写をスキップすることで素早い翻訳を実現しているのだと想定される。また興味深いことに、花粉管伸長中においても、新規の転写はさほど必要ではないことが分かってきた (Motomura et al. 2021, 2022)。花粉管のもつ重要かつ、伸長という特徴的な機能の維持のため、植物は構造的にシンプルな RNA の利点を活かして、戦略的な利用をしていることが推察される。これら花粉における mRNA レベルでの遺伝子発現制御の詳細については別途総説を執筆しているので、詳しくはそちらを参照されたい (Motomura 2024)。

7. おわりに

本論文では、被子植物の花粉において近年発見された、モバイル RNA の動態と機能に焦点を当て、これらが植物の生殖プロセスにどのように関わるのか、その可能性について紹介した。体細胞組織でモバイル RNA が多数報告されているのと同様に、花粉においても戦略分子としてモバイル RNA が様々な役割を持っている可能性は高い。特に花粉においては easiRNA に代表されるように、生殖プロセスに関連した植物種間の隔離など、種の繁栄や進化と密接に関わるような現象に関与する例が多い。実際にモバイル sRNA である siR854 は、種間の遺伝的隔離を促進し、種の多様化に重要な役割を果たしていることが示唆される (図 3)。また別の RNA の戦略的な利用法として、競争が激しい環境下において、迅速な発芽や転写に依存しない花粉管の伸長など、生存戦略を支える重要な要素にもなりうるということが明らかとなってきた。このようなメカニズムは、植物が生態系内での競争に適応し、生存と繁栄を確保するための進化的戦略の一環として発展してきたことが推察される。

植物細胞におけるモバイル RNA の存在自体は、ウイルス RNA の移行などにより半世紀近く前より認知されていたものの、移行の詳細などについては長らく不明であった。しかし次世代シーケンサーの発展などにより、この 15 年程度での当該分野の発展は目覚ましい。花粉におけるモバイル RNA 研究も同様に、これらの発見を土台として今後飛躍的に発展することが期待される。今後は、モバイル RNA の種間での機能的な違い、あるいは発展的な研究として siR854 などに代表される生態系内での生物種間での動態を解明することが、植物生物学に新たな視点をもたらすであろう。

引用文献

- Akita K., Takagi T., Kobayashi K., Kuchitsu K., Kuroiwa T., Nagata N. (2021). Ultrastructural characterization of microlipophagy induced by the interaction of vacuoles and lipid bodies around generative and sperm cells in Arabidopsis pollen. *Protoplasma* 258, 129–138. doi: 10.1007/s00709-020-01557-2.
- Betti F, Ladera-Carmona MJ, Weits DA, Ferri G., Iacopino S, Novi G, Svezia B, Kunkowska AB, Santaniello A, Piaggese A, et al. (2021). Exogenous miRNAs induce post-transcriptional gene silencing in plants. *Nat Plants* 7, 1379–1388. doi: 10.1038/s41477-021-01005-w.
- Borges F, Parent J-S, van Ex F, Wolff P, Martínez G, Köhler C, Martienssen RA. (2018). Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in Arabidopsis. *Nat. Genet.* 50, 186–192. doi: 10.1038/s41588-017-0032-5.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. *Cell* 128, 1089–1103. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.043.
- Brennecke J, Malone CD, Aravin AA, Sachidanandam R, Stark A, Hannon GJ. (2008). An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 322, 1387–1392. doi: 10.1126/science.1165171.
- Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin FM, Palmquist J, Huang S-D, Jin H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 1126–1129. doi: 10.1126/science.aar4142.
- Charzyńska M, Ciampolini F, Cresti M. (1988). Generative cell division and sperm cell formation in barley. *Sex. Plant Reprod.* 1, 240–247. doi: 10.1007/BF00189159.
- Chow HT, Mosher RA. (2023). Small RNA-mediated DNA methylation during plant reproduction. *Plant Cell*. doi:10.1093/plcell/koad010.
- Cresti M, Lancelle SA, Hepler PK. (1987). Structure of the generative cell wall complex after freeze substitution in pollen tubes of Nicotiana and Impatiens. *J. Cell Sci.* 88, 373–378. doi: 10.1242/jcs.88.3.373.
- de Felippes FF, Ott F, Weigel D. (2011). Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* 39, 2880–2889. doi: 10.1093/nar/gkq1240.

- Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Ramaraj T, Kianian S, Pawlowski WP, Mudge J, Chen C. (2016). Novel Meiotic miRNAs and Indications for a Role of PhasiRNAs in Meiosis. *Front. Plant Sci.* 7, 762. doi: 10.3389/fpls.2016.00762.
- Grant-Downton R, Kourmpetli S, Hafidh S, Khatab H, Le Trionnaire G, Dickinson H, Twell D. (2013). Artificial microRNAs reveal cell-specific differences in small RNA activity in pollen. *Curr. Biol.* 23, R599–601. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.055.
- Hamamura Y, Saito C, Awai C, Kurihara D, Miyawaki A, Nakagawa T, Kanaoka MM, Sasaki N, Nakano A, Berger F, et al. (2011). Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 21, 497–502. doi: 10.1016/j.cub.2011.02.013.
- Hao H, Li Y, Hu Y, Lin J. (2005). Inhibition of RNA and protein synthesis in pollen tube development of *Pinus bungeana* by actinomycin D and cycloheximide. *New Phytol.* 165, 721–729. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01290.x.
- He B, Cai Q, Qiao L, Huang C-Y, Wang S, Miao W, Ha T, Wang Y, Jin H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nat Plants* 7, 342–352. doi: 10.1038/s41477-021-00863-8.
- Herridge RP, Dolata J, Migliori V, de Santis Alves C, Borges F, Van Ex F, Lin A, Bajczyk M, Leonardi T, Hendrick A, et al. (2023). Pseudouridine guides germline small RNA transport and epigenetic inheritance. *bioRxiv*, 2023.05.27.542553. doi: 10.1101/2023.05.27.542553.
- Higashiyama T, Takeuchi H. (2015). The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 393–413. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-115635.
- Honys D, Twell D. (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 5, R85. doi: 10.1186/gb-2004-5-11-r85.
- Jiang H, Yi J, Boavida LC, Chen Y, Becker JD, Köhler C, McCormick S. (2015). Intercellular communication in *Arabidopsis thaliana* pollen discovered via AHG3 transcript movement from the vegetative cell to sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13378–13383. doi: 10.1073/pnas.1510854112.
- Kitagawa M, Tran TM, Jackson D. (2023). Traveling with purpose: cell-to-cell transport of plant mRNAs. *Trends Cell Biol.* doi:10.1016/j.tcb.2023.05.010.
- Kitagawa M, Wu P, Balkunde R, Cunniff P, Jackson D. (2022). An RNA exosome subunit mediates cell-to-cell trafficking of a homeobox mRNA via plasmodesmata. *Science* 375, 177–182. doi: 10.1126/science.abm0840.
- Li C, Gu M, Shi N, Zhang H, Yang X, Osman T, Liu Y, Wang H, Vatish M, Jackson S, et al. (2011). Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction. *Sci. Rep.* 1, 73. doi: 10.1038/srep00073.
- Liu L, Chen X. (2018). Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat Plants* 4, 869–878. doi: 10.1038/s41477-018-0288-5.

- Long J, Walker J, She W, Aldridge B, Gao H, Deans S, Vickers M, Feng X. (2021). Nurse cell--derived small RNAs define paternal epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Science* 373. doi:10.1126/science.abh0556.
- Lopez-Gomollon S, Baulcombe DC. (2022). Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 645–662. doi: 10.1038/s41580-022-00496-5.
- Lucas WJ, Lee J-Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 712–726. doi: 10.1038/nrm1470.
- Maizel A, Markmann K, Timmermans M, Wachter A. (2020). To move or not to move: roles and specificity of plant RNA mobility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 57, 52–60. doi: 10.1016/j.pbi.2020.05.005.
- Martínez G, Köhler C. (2017). Role of small RNAs in epigenetic reprogramming during plant sexual reproduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 36, 22–28. doi: 10.1016/j.pbi.2016.12.006.
- Martínez G, Panda K, Köhler C, Slotkin RK. (2016). Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nat Plants* 2, 16030. doi: 10.1038/nplants.2016.30.
- Martínez G, Wolff P, Wang Z, Moreno-Romero J, Santos-González J, Conze LL, DeFraia C, Slotkin RK, Köhler C. (2018). Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 50, 193–198. doi: 10.1038/s41588-017-0033-4.
- Mayer E, Gottsberger G. (2000). Pollen viability in the genus *Silene* (Caryophyllaceae) and its evaluation by means of different test procedures. *Flora* 195, 349–353. doi: 10.1016/S0367-2530(17)30993-3.
- McCue AD, Cresti M, Feijó JA, Slotkin RK. (2011). Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J. Exp. Bot.* 62, 1621–1631. doi: 10.1093/jxb/err032.
- Mogensen HL. (1992). The Male Germ Unit: Concept, Composition, and Significance. *International Review of Cytology*, 129–147. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61095-5
- Motomura K. (2024). Temporal Gene Expression and Functional Acquisition in Pollen Tubes. *Plant Morphology* in press.
- Motomura K, Arae T, Araki-Uramoto H, Suzuki Y, Takeuchi H, Suzuki T, Ichihashi Y, Shibata A, Shirasu K, Takeda A, et al. (2020). AtNOT1 is a novel regulator of gene expression during pollen development. *Plant Cell Physiol.* 61, 712–721. doi: 10.1093/pcp/pcz235.
- Motomura K, Sugi N, Takeda A, Yamaoka S, Maruyama D. (2022). Possible molecular mechanisms of persistent pollen tube growth without de novo transcription. *Front. Plant Sci.* 13, 1020306. doi: 10.3389/fpls.2022.1020306.
- Motomura K, Takeuchi H, Notaguchi M, Tsuchi H, Takeda A, Kinoshita T, Higashiyama T, Maruyama D. (2021). Persistent directional growth capability in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes after nuclear elimination from the apex. *Nat. Commun.* 12, 2331. doi: 10.1038/s41467-021-22661-8.
- Nonomura K-I. (2018). Small RNA pathways responsible for non-cell-autonomous regulation of plant reproduction. *Plant Reprod.* 31, 21–29. doi: 10.1007/s00497-018-0321-x.

- Nonomura K-I, Morohoshi A, Nakano M, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata N. (2007). A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19, 2583–2594. doi: 10.1105/tpc.107.053199.
- Russell SD. (1984). Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*. *Planta* 162, 385–391. doi: 10.1007/BF00393450.
- Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurđzić M, Becker JD, Feijó JA, Martienssen RA. (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136, 461–472. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.038.
- Song J, Tachibana S. (2007). Loss of viability of tomato pollen during long-term dry storage is associated with reduced capacity for translating polyamine biosynthetic enzyme genes after rehydration. *J. Exp. Bot.* 58, 4235–4244. doi: 10.1093/jxb/erm280.
- Southworth D, Kwiatkowski S. (1996). Arabinogalactan proteins at the cell surface of *Brassica* sperm and *Lilium* sperm and generative cells. *Sex. Plant Reprod.* 9, 269–272. doi: 10.1007/BF02152701.
- Sugi N, Izumi R, Tomomi S, Susaki D, Kinoshita T, Maruyama D. (2023). Removal of the endoplasmic membrane upon sperm cell activation after pollen tube discharge. *Front. Plant Sci.* 14, 1116289. doi: 10.3389/fpls.2023.1116289.
- Tamotsu H, Koizumi K, Briones AV, Komiya R. (2023). Spatial distribution of three ARGONAUTES regulates the anther phasiRNA pathway. *Nat. Commun.* 14, 3333. doi: 10.1038/s41467-023-38881-z.
- Teng C, Zhang H, Hammond R, Huang K, Meyers BC, Walbot V. (2020). Dicer-like 5 deficiency confers temperature-sensitive male sterility in maize. *Nat. Commun.* 11, 2912. doi: 10.1038/s41467-020-16634-6.
- Vaucheret H, Voinnet O. (2024). The plant siRNA landscape. *Plant Cell* 36, 246–275. doi: 10.1093/plcell/koad253.
- Wang G, Jiang H, Del Toro de León G, Martínez G, Köhler C. (2018). Sequestration of a Transposon-Derived siRNA by a Target Mimic Imprinted Gene Induces Postzygotic Reproductive Isolation in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 46, 696–705.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2018.07.014.
- Wang M, Dean RA. (2020). Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Mol. Plant Pathol.* 21, 589–601. doi: 10.1111/mpp.12911.
- Wang S, He B, Wu H, Cai Q, Ramírez-Sánchez O, Abreu-Goodger C, Birch PRJ, Jin H. (2023a). Plant mRNAs move into a fungal pathogen via extracellular vesicles to reduce infection. *Cell Host Microbe*. doi:10.1016/j.chom.2023.11.020.
- Wang X, Ramat A, Simonelig M, Liu M-F. (2023b). Emerging roles and functional mechanisms of PIWI-interacting RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 123–141. doi: 10.1038/s41580-022-00528-0.
- Weber M. (1988). Formation of sperm cells in *Galium mollugo* (Rubiaceae), *Trichodiadema setuliferum* (Aizoaceae), and *Avena sativa* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 161, 53–64. doi: 10.1007/BF00936012.

- Wu W, Li L, Zhao Y, Zhao Y, Jiang T, McCormick S, Zheng B. (2020). Heterochromatic silencing is reinforced by ARID1-mediated small RNA movement in Arabidopsis pollen. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.16871.
- Wu W, Zheng B. (2019). Intercellular delivery of small RNAs in plant gametes. *New Phytol.* 224, 86–90. doi: 10.1111/nph.15854.
- Yang L, Machin F, Wang S, Saplaoura E, Kragler F. (2023). Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nat. Biotechnol.* doi: 10.1038/s41587-022-01585-8.
- Yang L, Perrera V, Saplaoura E, Apelt F, Bahin M, Kramdi A, Olas J, Mueller-Roeber B, Sokolowska E, Zhang W, et al. (2019). m5C Methylation Guides Systemic Transport of Messenger RNA over Graft Junctions in Plants. *Curr. Biol.* 29, 2465–2476.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.06.042.
- Yu H-S, Hu S-Y, Zhu C. (1989). Ultrastructure of sperm cells and the male germ unit in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma* 152, 29–36. doi: 10.1007/BF01354237.
- Yu Z, Chen W, Wang Y, Zhang P, Shi N, Hong Y. (2021). Mobile Flowering Locus T RNA - Biological Relevance and Biotechnological Potential. *Front. Plant Sci.* 12, 792192. doi: 10.3389/fpls.2021.792192.
- Zhai J, Zhang H, Arikait S, Huang K, Nan G-L, Walbot V, Meyers BC. (2015). Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phase RNAs in maize anthers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 3146–3151. doi: 10.1073/pnas.1418918112.
- Zhan J, Meyers BC. (2023). Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 74, 21–51. doi: 10.1146/annurev-arplant-070122-035226.
- Zhang W, Thieme CJ, Kollwig G, Apelt F, Yang L, Winter N, Andresen N, Walther D, Kragler F. (2016). tRNA-Related Sequences Trigger Systemic mRNA Transport in Plants. *Plant Cell* 28, 1237–1249. doi: 10.1105/tpc.15.01056.